

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-126236

(43)Date of publication of application : 07.05.2003

(51)Int.Cl. A61L 27/00

(21)Application number : 2002-302500 (71)Applicant : KOREA INST OF SCIENCE & TECHNOLOGY

(22)Date of filing : 17.10.2002 (72)Inventor : KIN EIKA
KIN JUGEN
LEE SANYON
KIM ZAISAN
GO TEIKAN

(30)Priority

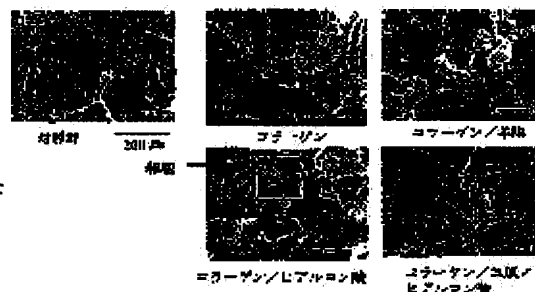
Priority number : 2001 200164182 Priority date : 18.10.2001 Priority country : KR

(54) POROUS SUPPORT BODY PREPARED FROM BIODEGRADABLE POLYMER FOR REGENERATION OF DAMAGED OCULAR TISSUE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a porous support body prepared from a biodegradable polymer for regenerating and curing damaged ocular tissues by being embedded in a damaged ocular area.

SOLUTION: The porous support body for regenerating damaged ocular tissues is prepared from one or more kind of biodegradable polymer selected from among a group including a polyglycolic acid, polylactic acid, polycaprolactone, polydioxanone, polytrimethylene carbonate and a copolymer of these. The support body has a porous diameter of 10-800 μm and a porosity of 50-99%. The support body is embedded in damaged ocular tissues i.e., a cornea, a conjunctiva or a haptic, thereby regenerating and curing the ocular tissues without causing any side-effect.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 17.10.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 19.10.2004

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-126236

(P2003-126236A)

(43) 公開日 平成15年5月7日 (2003.5.7)

(51) Int.Cl.⁷

A 6 1 L 27/00

識別記号

F I

A 6 1 L 27/00

データベース* (参考)

D 4 C 0 8 1

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2002-302500 (P2002-302500)

(22) 出願日 平成14年10月17日 (2002.10.17)

(31) 優先権主張番号 2 0 0 1 - 0 6 4 1 8 2

(32) 優先日 平成13年10月18日 (2001.10.18)

(33) 優先権主張国 韓国 (K R)

(71) 出願人 399101854

コリア インスティテュート オブ サイ
エンス アンド テクノロジー大韓民国, ソウル 136-130, スンブケー
ク, ハウォルコックードン 39-1

(72) 発明者 金 泳夏

大韓民国ソウル特別市江南区鴨鳴停洞484
漢陽アパート62-1103

(74) 代理人 100078662

弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 損傷された眼球組織の再生のための生分解性高分子から製造された多孔性支持体

(57) 【要約】

【課題】 損傷された眼球部位に埋込することにより、損傷された眼球部位に眼球組織を再生させて損傷された眼球組織を治癒するための、生分解性高分子から製造された多孔性支持体に関する。

【解決手段】 本発明の損傷された眼球組織再生用多孔性支持体は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン、ポリトリメチレンカルボネート及びこれらの共重合体からなる群から選択される1種類以上の生分解性高分子から製造され、空隙の孔径が10～800 μm であり、空隙率が50～99%である。損傷された眼球部位、即ち角膜、結膜及び鞏膜に本発明の多孔性支持体を埋込して副作用を惹起することなく眼球組織を再生/治癒することができる。



対照群

200 μm 

コラーゲン



コラーゲン/羊膜



コラーゲン/ヒアルロン酸

コラーゲン/羊膜/
ヒアルロン酸

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン、ポリトリメチレンカルボネート及びこれらの共重合体からなる群から選択される 1 種類以上の生分解性高分子から製造された、空隙の孔径が $10 \sim 800 \mu\text{m}$ であり、空隙率が $50 \sim 99\%$ である、損傷された眼球組織再生用多孔性支持体。

【請求項 2】 眼球部位が、角膜、結膜及び鞏膜からなる群から選択されるものである、請求項 1 記載の支持体。

【請求項 3】 生分解性高分子が、ポリ（乳酸／グリコール酸）、ポリ（乳酸／カプロラクトン）及びポリ（グリコール酸／カプロラクトン）からなる群から選択されるものである、請求項 1 記載の支持体。

【請求項 4】 その表面にコラーゲン、ヒアルロン酸、キトサン、羊膜抽出物又はこれらの混合物がコーティングされた、請求項 1 記載の支持体。

【請求項 5】 空隙の孔径が $50 \sim 600 \mu\text{m}$ である、請求項 1 記載の支持体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術】 本発明は、損傷された眼球部位に埋込することにより、損傷された眼球部位に眼球組織を再生させて損傷された眼球組織を治癒するための、生分解性高分子から製造された多孔性支持体に関する。

【0002】 更に具体的に、本発明は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン、ポリトリメチレンカルボネート及びこれらの共重合体からなる群から選択される 1 種類以上の生分解性高分子から製造された、空隙の孔径が約 $10 \sim 800 \mu\text{m}$ であり、空隙率が約 $50 \sim 99\%$ である、損傷された眼球組織再生用多孔性支持体を提供する。

【0003】

【従来の技術】 眼球は全体的に鞏膜 (sclera) により囲まれており、瞳の前の部分は、光が通過する角膜 (cornea) と、角膜と鞏膜を連結し、目の内部の眼結膜まで連結された袋状の結膜 (conjunctiva) とで構成されている。

【0004】 角膜は厚さが $1 \sim 1.2 \text{mm}$ であり、神経は分布されているものの、血管のない透明な膜として光を屈折透過させる。角膜は組織学的に上皮、ボウマン膜、間質、デスメ膜、内皮の 5 層で構成されており、上皮は損傷を受けると $1 \sim 2$ 日以内に素早く再生されるが、内皮は再生し難い。結膜及び鞏膜には血管があり、大部分繊維細胞で構成された膜として容易に再生される。角膜と結膜は眼球の前方に露出されているため、外傷、火傷、化学薬品により損傷されることがあり、更に種々の病変及び感染により組織壊死が発生することがある。鞏膜は内部に位置しているが、やはり病変及び感染により損傷されることがある。損傷された角膜上皮、結膜及び鞏膜

は容易に回復するが、回復速度が速すぎると瘢痕 (scar) が生じやすい。

【0005】 損傷された角膜を治療するには、一般的には、死体から採取して移植する方法が非常に成功的に行なわれているが、生体角膜の供給が不足し、また患者にスティーブンス-ジョンソン (Stevens-Johnson) 疾病 (涙不足症) などの疾病があれば失敗し易い。人工物質で製造された人工角膜については長期間研究されてきたにも拘わらず、未だ臨床的に成功率が非常に低い (T.

10 V. Chirila ら、J. Biomed. Mater. Res., 28, 745, 1994 など参照) (非特許文献 1 参照)。即ち、移植された人工角膜が剥がれたり、鞏膜が壊死し、周囲組織が腐って行くなどの合併症により失敗率が高い。これは、人工角膜として用いられる材料の生体適合性 (biocompatibility) が優れておらず、生体角膜との接合力が弱いのである。このような問題点を解決するために、米国特許 (第 5,836,313 号, E. Perez ら) (特許文献 1 参照) には角膜組織 (コラーゲン) とヒドロゲル (hydrogel、ポリエチレンオキシドなど親水性高分子の架橋体) が複合結合された人工角膜が記述されているが、実際の臨床で適用された結果はない。角膜の損傷がそれ程大きくない場合や、レーザ施術後の副作用、炎症、感染された角膜の治療の場合には、羊膜 (胎盤の最内側膜として胎児を取り囲んでいる薄い半透明膜) でその部位を被覆すること方法が行なわれており、これにより炎症が減少し、細胞の成長を促進させて効果的に治癒されることも可能である (米国特許第 6,143,315 号, M. X. Wang ら参照) (特許文献 2 参照)。しかし、このような方法は損傷部位が大きい場合や、損傷の程度が酷い場合には適用できないという限界がある。

【0006】 一方、損傷された結膜を治療する方法も完全ではない。現在、病変のある結膜を除去した後、下に露出された鞏膜を覆うために周辺の結膜を引張って縫合させる結膜表面再建術が行われているが、これは美容上、機能上の障害をもたらし、病変があまりにも広範囲な場合には手術が不可能である。

【0007】 近来、生分解性高分子支持体 (scaffold) を利用して損傷された生体組織や臓器を再生する組織工学 (tissue engineering) が盛んに研究されている。このような場合、生分解性高分子支持体としては、多孔性 (porous) 物質が用いられ、その内外部に細胞が付着して成長しながら支持体が徐々に分解消滅される。現在、支持体の化学的な性質／表面物性と細胞の付着／成長の相関関係、支持体の空隙 (pore) サイズの効果、細胞の付着及び養育条件などに関して多くの研究が進行されている。現在、このような組織工学技術を利用して人工皮膚と人工肝が成功しており、軟骨と人工骨、人工血管、人工膀胱、人工心臓弁膜、神経再生に対する研究が盛んに展開されている (R. C. Thomason ら、Adv. Polym. Sci., 122, 245, 1995 など参照) (非特許文献 2 参照)。

角膜も組織工学研究の対象の一つであるが、未だ実験段階であり、実用には長期間が要されている (L. Germain ら、Pathobiology, 67, 140, 1999 など参照) (非特許文献 3 参照)。

【0008】前記生分解性高分子としては、ポリグリコール酸、ポリ乳酸などの合成高分子及びこれらの共重合体、又はヒアルロン酸、キトサンなどの天然高分子及びこれらの混合物からなる群から選択される材料が使用されている。

【0009】このような多孔性支持体としては、高分子の繊維不織布 (fiber mesh) を用いたり、又は塩浸出法、乳化凍結乾燥法、相分離法、高圧気体膨張法、塩発泡法などにより製造されている。

【0010】このような生分解性高分子支持体の役割は、3 次元的に組織が付着して成長することができ、細胞の成長及び新たな組織形成に必要な栄養分と特定の成長因子を伝達することである。窮極的には細胞の増殖、成長と共に細胞外の基質が分泌されて新たな組織が形成され、高分子支持体は徐々に分解されて完全に消滅されるため、細胞群と細胞外の基質のみで構成された新たな組織代替物が完成される。従って、このような生分解性高分子支持体は無毒であり、組織に対する生体適合性 (tissue compatibility) に優れていなければならない、機械的な強度が充分で細胞が付着して成長する間は形態を維持しなければならない反面、分解速度が適当で細胞の成長と共に分解消滅する必要がある。従って、組織工学の対象に応じて前記合成高分子が適当な割合で混合された組成の共重合体が多用される。特に、グリコール酸、乳酸及びカプロラクトンで構成された共重合体は入手し易く、物性及び分解速度に関する資料が多いため最も多く使用されている。

【0011】多孔性生分解性高分子支持体に細胞が付着して成長する工程は非常に重要である。細胞の付着は細胞の種類と材料の化学的な組成と表面の物性 (特に材料の疎水性/親水性)、空隙の孔径及び細胞の付着方法によって差が大きい。一般的に合成高分子は疎水性であるため細胞付着 (更に細胞が含有された培養液の濡れ性 (wetting)) が少ない。

【0012】反面、コラーゲン、ヒアルロン酸、キトサンなどの天然高分子は親水性が大きいので細胞の付着が多いが、機械的な強度が弱く、分解速度の調節が困難である。従って、疎水性高分子の表面を物理的及び化学的な方法で親水化する方法 (J. Gao ら、J. Biomed. Mater. Res., 42, 417, 1998 など参照) (非特許文献 4 参照) 又は天然高分子をコーティングして使用する方法 (M. D. M. Evans ら、J. Biomed. Mater. Res., 56, 461, 2001 など参照) (非特許文献 5 参照) などが報告されている。

【0013】付着された細胞が成長する速度と細胞の生理学的な活性度も前述の要素により差が大きい、細胞

の付着と成長速度が必ずしも比例するものではない。その中でも空隙の孔径と分布が細胞の成長を決定する非常に重要な要素であり、空隙が互いに連結された (inter-connecting) 構造であると、栄養液が支持体の内部まで均一に浸透して細胞が良好に成長する。

【0014】上記のような生分解性高分子を用いて多孔性支持体を製造する方法としては種々のものがある。繊維不織布 (nonwoven mesh) には空隙が多く、表面積が広いので頻繁に使用されている。より容易な方法は、生分解性高分子の有機溶媒溶液に、これには溶解しない塩などの粒子を混合してキャストした後に溶媒を除去し、水で塩粒子を溶出除去する塩浸出法 (solvent-casting/particulate-leaching method) で、塩粒子のサイズと混合比率を調節することにより多様な空隙の孔径と空隙率 (porosity) を有する多孔性構造を得ることができる。

【0015】これ以外にも、生分解性高分子溶液にアンモニウムビカルボネート (酸性水溶液や高温の水と反応して二酸化炭素とアンモニアガスに分解される) 粒子を混合してマトリックスを作り、有機溶媒を一部除去した後、高温の蒸留水に浸漬して塩を発泡させて除去する塩発泡法 (gas foaming/salt leaching)、高分子の有機溶媒溶液/水の乳化液 (emulsion) を凍結乾燥して有機溶媒と水を除去する乳化凍結乾燥法 (emulsion freeze-drying)、高分子の有機溶媒溶液に昇華性物質又は溶解度が異なる溶媒を追加し、昇華又は温度変化による相分離 (phase separation) により多孔性支持体を製造する相分離法、有機溶媒を使用しない方法として生分解性高分子を鋳型に入れ圧力を加えてペレットを作り、適当な温度で高圧の炭酸ガスを生分解性高分子に注入した後、徐々に圧力を下げてマトリックス内の炭酸ガスを放出させて空隙を形成する高圧気体膨張法 (high pressure gas expansion) などが報告されている。

【0016】

【特許文献 1】米国特許第 5 8 3 6 3 1 3 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 6 1 4 3 3 1 5 号明細書

【非特許文献 1】ティー・ブイ・キリラ (T. V. Chirila) ら、「ジャーナル・オブ・バイオメディカル・マテリアル・リサーチ (Journal of Biomedical Material Research)」、(米国)、1994 年、第 28 巻、p. 745

【非特許文献 2】アール・シー・トマソン (R. C. Thomson) ら、「アドバンス・イン・ポリマー・サイエンス (Advances in Polymer Science)」、ドイツ、1995 年、第 122 巻、p. 245

【非特許文献 3】エル・ジャーメイン (L. Germain) ら、「パソバイオロジー (Pathobiology)」、(スイス)、1999 年、第 67 巻、p. 140

【非特許文献 4】ジェイ・ガオ (J. Gao) ら、「ジャーナル・オブ・バイオメディカル・マテリアル・リサーチ (Journal of Biomedical Material Research)」、

(米国)、1998年、第42巻、p. 417

【非特許文献5】エム・ディー・エム・エバンス (M. D. M. Evans) ら、「ジャーナル・オブ・バイオメディカル・マテリアル・リサーチ (Journal of Biomedical Material Research)」、(米国)、2001年、第56巻、p. 461

【0017】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的は、損傷された角膜、結膜及び鞏膜などの眼球部位に埋込することにより副作用を惹起することなく、損傷された眼球部位に眼球組織を再生させて損傷された眼球組織を治癒させるための、生分解性高分子から製造された多孔性支持体を提供することである。

【0018】本発明者らは、グリコール酸、乳酸、カプロラクトン、ジオキサノン又はトリメチレンカルボネートで製造された生分解性高分子共重合体を使用し、前述したような製造方法により製造した空隙の孔径が約10～800 μm であり、空隙率が約50～99%である多孔性支持体が、眼球組織再生用多孔性支持体として優れた効果を有することを発見した。

【0019】

【課題を解決するための手段】したがって、本発明は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリカプロラクトン、ポリジオキサノン、ポリトリメチレンカルボネート及びこれらの共重合体からなる群から選択される1種類以上の生分解性高分子から製造された、空隙の孔径が約10～800 μm 、より好ましくは約50～600 μm であり、空隙率が約50～99%、より好ましくは約75～97%である、損傷された眼球組織再生用多孔性支持体に関する。

【0020】前述のように、組織工学に使用される生分解性多孔性高分子支持体は無毒であり、組織に対する生体適合性に優れていなければならず、機械的な強度が充分で細胞が付着して成長する間は形態を維持しなければならない反面、分解速度が適当で細胞の成長と共に分解消滅する必要がある。本発明の多孔性支持体を使用する高分子は、グリコール酸、乳酸、カプロラクトン、ジオキサノン、又はトリメチレンカルボネートで組成された高分子及びこれらの共重合体である。ポリグリコール酸は強度は大きい、分解が非常に速くて3ヶ月以内に完全に分解される。ポリ乳酸は、強度は大きい、分解が非常に遅くて完全に分解するのに6ヶ月～1年を要する。ポリカプロラクトンは強度が弱く、分解速度がポリ乳酸より遅い。本発明の多孔性支持体を使用する高分子の分子量は、好ましくは約10,000～500,000であり、より好ましくは約15,000～400,000である。分子量が小さすぎると、強度が小さくなり、早く分解される一方、分子量が大きすぎると、分解速度が遅くなる。

【0021】従って、本発明の多孔性支持体において

は、好ましくは適度な強度及び分解速度を有する前記合成高分子の2成分以上の共重合体をより効果的に使用することができる。このような共重合体は、グリコール酸、乳酸、カプロラクトン、ジオキサノン、及びトリメチレンカルボネートの2成分共重合体；例えば、ポリ(乳酸/グリコール酸)、ポリ(グリコール酸/カプロラクトン)、ポリ(グリコール酸/ジオキサノン)、ポリ(グリコール酸/トリメチレンカルボネート)、ポリ(乳酸/カプロラクトン)、ポリ(乳酸/ジオキサノン)、ポリ(乳酸/トリメチレンカルボネート)、ポリ(カプロラクトン/ジオキサノン)、ポリ(カプロラクトン/トリメチレンカルボネート)又はグリコール酸、乳酸、カプロラクトン、ジオキサノン、及びトリメチレンカルボネートの3成分以上の共重合体から選択され得る。特に、ポリ(乳酸/グリコール酸)、ポリ(グリコール酸/カプロラクトン)、及びポリ(乳酸/カプロラクトン)は、機械的な強度に優れ、体内で8～12週内に分解するため、本発明の多孔性支持体においては非常に好ましい。

20 【0022】また本発明の多孔性支持体においては、空隙の孔径は、約10～800 μm 、より好ましくは約50～600 μm であり、空隙率は、約50～99%、より好ましくは約75～97%である。かかる空隙の孔径と空隙率を有することで、本発明の多孔性支持体は、優れた眼球組織再生効果を示す。

30 【0023】このような合成高分子を用いて多孔性支持体を製造する方法は、前述のように繊維不織布利用法、塩浸出法、塩発泡法、乳化凍結乾燥法、相分離法、又は高圧気体膨張法から選択することができる。この中で最も容易な方法は塩浸出法であり、生分解性高分子を有機溶媒に溶解し、その有機溶媒には溶解しない食塩などの水溶性無機塩の粒子を混合してキャストした後に溶媒を除去し、水を使用して塩粒子を溶出除去する方法である。また、水溶性無機塩の代わりに水溶性デンプンを用いることもできる。食塩が粒子サイズの調節が容易であり、水によく溶解するので好ましく使用することができる。添加される塩粒子のサイズと混合比率を調節すれば、多様な空隙の孔径と空隙率を有する多孔性構造の支持体を得ることができる。前記の合成高分子は、ベンゼン、トルエン、クロロホルム、テトラヒドロフランなど及びこれらの混合溶媒に容易に溶解し、通常使用される濃度は約0.3～20重量/体積%である。

40 【0024】塩以外に有機溶媒に溶解しない塩の粒子なども使用することができるが、塩が最も入手し易く、種々のサイズの粒子に容易に作ることができるため便利である。本発明で好ましく使用しうる塩の粒径及び(生分解性高分子溶液に対する)混合率は、それぞれ約20～600 μm 及び約50～99重量/体積%である。

50 【0025】このような方法で製造した本発明の多孔性支持体は、機械的な強度に優れ、分解速度が調節できる

という長所がある。そしてこのような多孔性支持体の表面にコラーゲン、ヒアルロン酸、キトサン及び羊膜抽出物又はこれらの混合物をコーティングすることにより、表面の親水性を増加させ、細胞の初期付着及び成長を更に促進させることもできる。コラーゲン、ヒアルロン酸、キトサン及び羊膜抽出物又はこれらの混合物の約 0.01~5 重量/体積%水溶液に多孔性支持体を浸漬してコーティングした後、凍結乾燥するか、又は 50℃以下で真空乾燥する。あるいは、コーティングされたコラーゲンなどの天然高分子が洗い流されることを防止するためにコーティング後にグルタルアルデヒド又は水溶性カルボジイミド溶液中で 6 時間以上反応させて架橋化してもよい。

【0026】あるいは、合成高分子の代わりにコラーゲン、ヒアルロン酸、及びキトサンのような天然高分子、並びにこれらの混合物を利用して多孔性支持体を製造することもできる。これらの高分子の水溶液又は弱酸性溶液（場合によっては羊膜抽出物を含む）を -20℃で凍らせた後、凍結乾燥して多孔性支持体を製造し、グルタルアルデヒド又は水溶性カルボジイミド溶液中で 6 時間以上反応させて架橋化する。

【0027】このようにして調製した本発明の多孔性支持体は、損傷された眼球組織を再生させる効能を有するため、必要に応じて薄膜などの形態にし、必要に応じて適宜改質して、損傷された眼球部位をそれで被覆するとともに、眼球を物理的な接触から保護することによって、損傷された眼球部位の眼球組織の再生を促進することができる。本発明の多孔性支持体をどのような形態にして、どのように損傷された眼球部位に適用するかは、損傷の大きさ、程度等に応じて適宜決定することができる。

【0028】製造したこれらの多孔性支持体に、試験管内 (in vitro) で眼球上皮細胞 (corneal epithelial cell) 及び基質繊維芽細胞 (stromal fibroblast) を付着させて 1 日、4 日、及び 7 日間培養させた結果、これらの細胞が大きく成長することを発見した。細胞粘着及び成長は電子顕微鏡と H&E (ヘマトキシリン (hematoxylin) & エオシン (eosin)) 染色で測定/分析し、細胞から分泌された蛋白質の量を ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 方法で定量して細胞の生理的な活性を評価した。更に、天然高分子から製造された支持体、及びコラーゲンなどでコーティングされた支持体が、コーティングされていない支持体に比べて細胞が数等に大きく成長させていることを確認した。

【0029】ウサギの眼球表面、即ち、結膜、角膜又は鞏膜の表面の一部を意図的に損傷させた部位に、このような多孔性支持体を埋込して観察した結果、重度の炎症や大きな瘢痕無しに新たな眼球組織が再生し、欠損された部位を代替することにより損傷部位を治癒した事実を確認した。

【0030】

【実施例】下記の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明がこれらの実施例により制限されるものではない。

【0031】〔生分解性高分子多孔性支持体の製造及びコーティング方法〕

<方法 1> ポリ (乳酸/グリコール酸) 共重合体 (PLGA) - 塩浸出法
PLGA (乳酸/グリコール酸 = 50/50、分子量: 40,000~75,000) を溶媒 (クロロホルム) に 3 重量/体積%で溶解させた。次いで、塩をひき、篩にかけて種々のサイズ (0~50 μm、50~100 μm、100~400 μm、400~800 μm) に分別した塩を、塩: PLGA 溶液の重量比がそれぞれ 50:50、70:30、90:10、95:5 になるように混合して 10 cm ペトリ皿に注ぎ、冷凍室で溶媒を蒸発させた。得られた薄膜 (厚さ: 0.5~1.5 mm) を 48 時間蒸留水で塩を溶出させて図 1 のように空隙が互いに連結された多孔性支持体を製造した。支持体の平均空隙の孔径は 50~800 μm であり、空隙率は 45~98% であった。

【0032】<方法 2> ポリ (グリコール酸/カプロラクトン) 共重合体 (PGCL) - 乳化凍結乾燥法
PGCL (グリコール酸/カプロラクトン = 50/50、分子量: 130,000) をトルエンに 5 重量/体積%で溶解させた後、水を添加して超音波機器 (sonicator) で完全に混合して乳化させた。この乳化溶液を液体窒素で凍結させた後、真空中で乾燥させて平均空隙の孔径が 50~800 μm であり、空隙率が 45~98% である多孔性支持体を製造した。得られた多孔性支持体は厚さ 0.5~1.5 mm であり、図 1 のように空隙が互いに連結された構造を保有した。

【0033】<方法 3> PLGA 又は PGCL 多孔性支持体の表面改質

<方法 1> で得られた PLGA 多孔性支持体を 0.1 重量%コラーゲン溶液に 6 時間浸漬してコーティングした後、2 重量%カルボジイミド水溶液に 18 時間浸漬して化学的な架橋処理を行なった (PLGA/コラーゲン支持体)。また、同様な方法で 0.1 重量%のヒアルロン酸溶液でコーティングした PLGA/ヒアルロン酸支持体を製造した。更に、コラーゲンを塗布した後、更にヒアルロン酸溶液をコーティングして凍結乾燥させた PLGA/コラーゲン/ヒアルロン酸支持体も製造した。また、0.1 重量%のコラーゲン溶液にコラーゲンの 1/10 重量の羊膜粒子を混合して羊膜成分が含有された懸濁液を製造し、これに PLGA 支持体を浸漬してコーティングを施した PLGA/コラーゲン/羊膜支持体を製造した。また、ヒアルロン酸を塗布した後、羊膜成分が含有されたコラーゲン懸濁液で処理した PLGA/コラーゲン/ヒアルロン酸/羊膜支持体も製造した。

【0034】<方法2>で得られたPGCL多孔性支持体も前記と同様な方法で表面を改質してそれぞれPGCL/コラーゲン、PGCL/ヒアルロン酸、PGCL/コラーゲン/ヒアルロン酸、及びPGCL/コラーゲン/羊膜支持体を製造した。

【0035】〔多孔性支持体への細胞付着及び成長実験〕コラーゲン、ヒアルロン酸、及び羊膜で改質されたそれぞれのPLGA及びPGCL支持体を利用して眼球上皮細胞と基質繊維芽細胞の培養を行い、それぞれの細胞粘着率と増殖率を電子顕微鏡とH&E染色法で比較した。

【0036】眼球上皮細胞は、ダルベッコ改質イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) に1%ペニシリン、10%牛胎児血清、1×MEMアミノ酸、1×MEMビタミン、1×MEM非必須アミノ酸を添加して製造した培地を、基質繊維芽細胞は、ダルベッコ改質イーグル培地F12に40μg/mlゲンタマイシン (gentamicin)、15%牛胎児血清、5μg/mlインシュリン、0.1μg/mlコレラ毒素及び10ng/mlヒトEGFを添加して製造した培地をそれぞれ使用し、5%炭酸ガス濃度下で37℃飽和湿度で培養した。眼球上皮細胞及び基質繊維芽細胞を利用した増殖時間 (doubling time) の測定は約8週にかけて行い、眼球上皮細胞は第1の亜融合状態 (subconfluent state) に到達するまで約4週間かった。それぞれの細胞は、継代培養に入る前に細胞濃度1×10⁵個/mlの懸濁液200μlをそれぞれ5mlの培地を入れた6ウェルプレートに接種した後、37℃、5%炭酸ガス雰囲気下の細胞培養器で培養した。このようなプレートを20個ずつ準備した。各プレート中で培養した細胞を24時間置きに分離して単一細胞懸濁液を作った後、コールタカウンタ (Coulter counter) で5回ずつカウントし、細胞数が2倍及び4倍に到達する時間を測定した。

【0037】支持体をUV照射5分、70%EtOHに*

*1時間浸漬して滅菌した。細胞培養器内で支持体に細胞を5時間粘着させた後、1mlの培地を添加し、培地は2日ごとに交換しながら細胞を培養した。細胞の初期粘着率を高めるために細胞を動的方法で粘着させた。即ち、37℃、5%炭酸ガス細胞培養器の内部に100rpmで固定された振盪器 (orbital shaker) を設置し、多孔性支持体を、4×10⁶ cells/mlの細胞濃度に調節した眼球上皮細胞と基質繊維芽細胞の懸濁液に入れて動的状态で細胞を付着させた。表面の改質による眼球上皮細胞と基質繊維芽細胞の粘着と増殖を比較観察するために、それぞれ1日、4日及び7日間培養して電子顕微鏡とH&E染色で観察した。電子顕微鏡用試片は2.5%グルタルアルデヒド溶液で4時間固定し、H&E染色用試料は70%、80%、90%及び100%エタノールで順次的にそれぞれ20分間脱水した後、完全に真空乾燥した。

【0038】<実施例1><方法1>で得られた多様な空隙の孔径のPLGA多孔性支持体を0.5×0.5×0.7mm³のサイズで準備した。37℃、5%炭酸ガス細胞培養器内に設置した振盪器 (100rpmで固定) を使用してPLGA支持体を4×10⁶ cells/ml濃度の眼球上皮細胞の懸濁液に浸漬し、眼球上皮細胞を動的方法で支持体に粘着させた。それぞれ1日、4日、及び7日間体外培養して電子顕微鏡、H&E染色及びELISA方法で眼球上皮細胞の粘着と増殖を比較分析した。

【0039】PLGA多孔性支持体の空隙の孔径及び空隙率による眼球上皮細胞の粘着及び増殖の結果は、それぞれ表1及び表2に表した通りである。表1において、空隙の孔径が小さい場合、細胞粘着率が低く、細胞の増殖も遅いことを表し、100μm以上の空隙の孔径で高い粘着及び増殖が示された。更に、表2において空隙率が高いほど細胞の粘着や増殖が高く示された。

【0040】

【表1】

PLGA 支持体の空隙の孔径による眼球上皮細胞の粘着及び増殖結果				
蛋白質の生成量 (mg)	空隙の孔径			
	50μm以下	50~100μm	100~400μm	400~800μm
1日培養時	0.16	0.10	0.24	0.35
4日培養時	0.16	0.12	0.45	0.25

【0041】

※40※ 【表2】

PLGA 支持体の空隙率による眼球上皮細胞の粘着及び増殖結果				
蛋白質の生成量 (mg)	空隙率			
	50%	70%	90%	95%
1日培養時	0.10	0.11	0.14	0.15
4日培養時	0.20	0.27	0.45	0.35

【0042】<実施例2><方法2>で得られた多様な空隙の孔径と空隙率を有するPGCL多孔性支持体<実施例1>と同様な方法で基質繊維芽細胞を粘着させ、体外培養した。空隙の孔径及び空隙率による基質繊維芽

細胞の粘着及び増殖結果は、下記表3に表した通り<実施例1>の結果と類似した。

【0043】

【表3】

PGCL支持体の空隙の孔径による基質繊維芽細胞の粘着及び増殖結果				
蛋白質の生成量 (mg)	空隙の孔径			
	50 μ m以下	50~100 μ m	100~400 μ m	400~800 μ m
1日培養時	0.18	0.12	0.27	0.40
4日培養時	0.19	0.12	0.48	0.30

【0044】＜実施例3＞ 眼球上皮細胞の体外培養
＜方法3＞で得られた表面改質PLGA/コラーゲン、
PLGA/ヒアルロン酸、PLGA/コラーゲン/ヒアル
ロン酸、PLGA/コラーゲン/羊膜、及びPLGA
/コラーゲン/ヒアルロン酸/羊膜支持体と、改質され
ていない対照群PLGA支持体とを＜実施例1＞で記述
した方法で眼球上皮細胞を動的培養法で沈着させ、5時
間後に粘着された細胞の数を測定し（表4）、1日、4
日、及び7日間体外培養して眼球上皮細胞の粘着と増殖
を電子顕微鏡とH&E染色法で比較観察した。

【0045】表4から分るように、表面が改質されたP*

* LGA多孔性支持体が未処理対照群に比べて高い初期細
胞粘着率を表し、特にPLGA/コラーゲン/ヒアルロ
ン酸及びPLGA/コラーゲン/ヒアルロン酸/羊膜支
持体が優れた結果を表した。図1の電子顕微鏡写真及び
図2のH&E染色法で観察したように、多孔性支持体の
内部にも眼球上皮細胞が均一に成長されていることが確
認でき、PLGA/コラーゲン/ヒアルロン酸及びPL
GA/コラーゲン/ヒアルロン酸/羊膜支持体において
より多くの細胞が均一に成長している結果を確認した。

【0046】

【表4】

表面改質 PLGA 支持体に粘着してから5時間後の眼球上皮細胞の数						
支持体	PLGA	PLGA/コ ラーゲン	PLGA/ヒ アルロン 酸	PLGA/コラーゲ ン/ヒアルロン酸	PLGA/コラーゲ/ 羊膜	PLGA/コラー ゲン/ヒアルロ ン酸/羊膜
細胞数 (10 ⁴ 個/ 支持体)	11	14	30	35	14	40

【0047】＜実施例4＞＜方法2＞で得られた表面改
質PGCL/コラーゲン、PGCL/ヒアルロン酸、P
GCL/コラーゲン/ヒアルロン酸、PGCL/コラー
ゲン/羊膜及びPGCL/コラーゲン/ヒアルロン酸/
羊膜支持体を＜実施例1＞で記述した方法と同様に基質
繊維芽細胞を動的培養法で粘着させ、それぞれ1日、4
日、及び7日間体外培養して電子顕微鏡とH&E染色法
で分析した。

※30

表面改質 PGCL 支持体に粘着してから5時間後の基質繊維芽細胞の数						
支持体	PGCL	PGCL/コ ラーゲン	PGCL/ヒ アルロン 酸	PGCL/コラーゲ ン/ヒアルロン酸	PGCL/コラーゲ/ 羊膜	PGCL/コラー ゲン/ヒアルロ ン酸/羊膜
細胞数 (10 ⁴ 個/ 支持体)	18	15	28	38	18	42

【0050】＜実施例5＞ ウサギによる動物実験
体外実験で優れた細胞適合性を表した表面改質PLGA
及びPGCL多孔性支持体の治療効果をウサギによる動
物実験で評価した。ウサギの角膜、結膜、又は鞏膜の一
部組織を7mmのサイズで円型切除機を利用して除去した
（図3）。同一のサイズの多孔性支持体をUV照射及び
70%エタノールで滅菌した後、損傷させた部位に移植
して組織の再生を免疫細胞学的に評価し、多孔性支持体
を使用しない場合と比較して治癒効果及び治癒後の結膜
の収縮を分析した。支持体の移植後、周囲組織から細胞
が支持体の表面及び内部に成長して組織が再生すること
を数週～数ヶ月にかけて観察し、経時変化による角膜上
皮の再生とコラーゲンの沈着など組織の形成を確認し
た。角膜の場合には患部及び支持体上に更に新生血管生

※【0048】下記表5に表した通り、＜実施例3＞の結
果と類似して表面が改質されたPGCL多孔性支持体が
対照群に比べて基質繊維芽細胞の粘着が高く、支持体の
内部に更に多くの細胞が均一に増殖されていることが確
認できた。

【0049】

【表5】

成抑制効果がある羊膜を覆った。

【0051】図4に示されているように、損傷された結
膜部位にPLGA/コラーゲン/ヒアルロン酸/羊膜支
持体を移植した2週後に結膜が再生して治癒しているの
が確認された。再生した組織部位を切断してH&E染色
法で分析した結果、細胞（図5で濃く示されている部
分）が支持体の内部に均一に成長しており、一部分解さ
れずに残っている多孔性支持体（白い部分）も観察され
た（図5参照）。角膜輪部から結膜円蓋までの長さを測
定して組織の収縮を観察した結果、高分子支持体を移植
していない対照群の場合は組織が25%収縮したことに
対し、高分子支持体を移植した場合は6%のみが収縮
し、正常的な眼球運動が可能であることを観察した。3
ヶ月後には正常な結膜組織が完全に再生していることを

確認した。

【0052】同様な方法で損傷させた角膜、鞏膜及び結膜の組織部位に種々の表面改質PLGA及びPGCL多孔性支持体を移植した結果、損傷された組織が良好に再生していることが確認された。

【0053】

【発明の効果】本発明によれば、損傷された眼球部位、即ち角膜、結膜及び鞏膜に本発明の多孔性支持体を埋込すると、副作用を惹起することなく眼球組織を再生/治療することができる。

【図面の簡単な説明】

* 【図1】表面改質PLGA支持体に7日間培養した眼球上皮細胞断面の電子顕微鏡写真。

【図2】表面改質PLGA支持体に7日間培養した眼球上皮細胞断面のH&E染色写真。

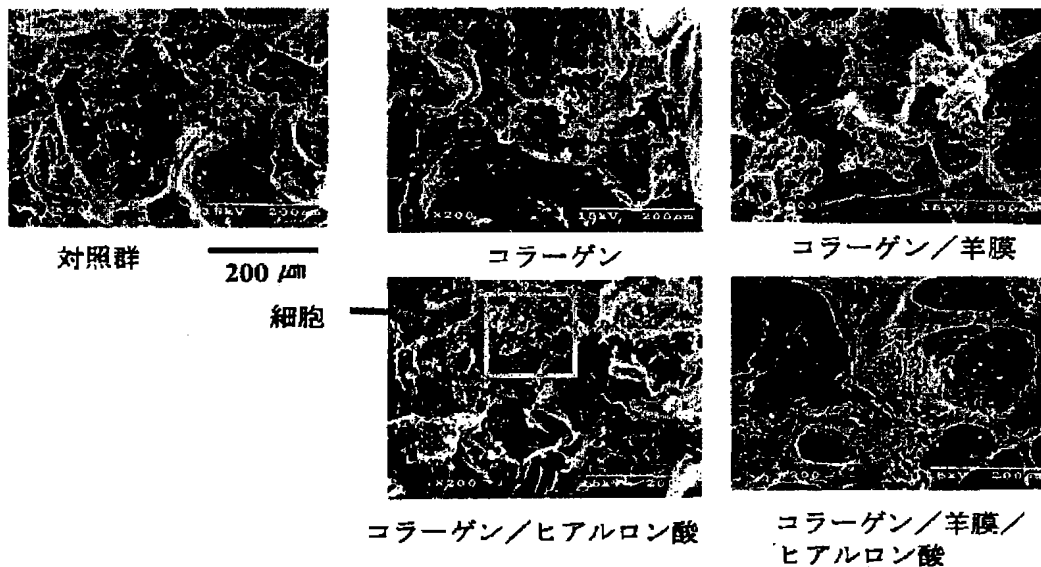
【図3】結膜再生動物実験の概略図。

【図4】PLGA/コラーゲン/ヒアルロン酸/羊膜支持体移植2週後の細隙灯検査及びフルオレセイン染色により結膜が再生されたことを示す写真。

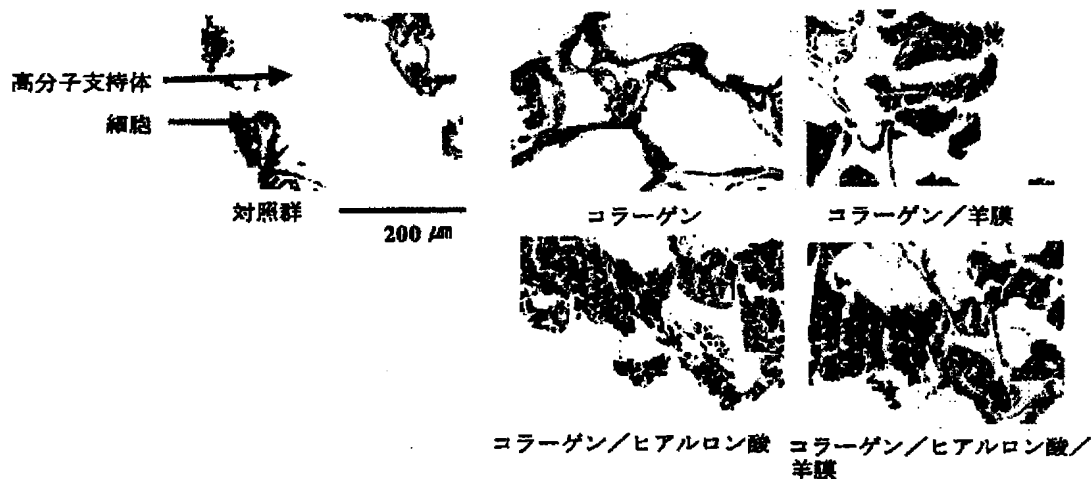
10 【図5】PLGA/コラーゲン/ヒアルロン酸/羊膜支持体移植2週後のH&E染色写真。

*

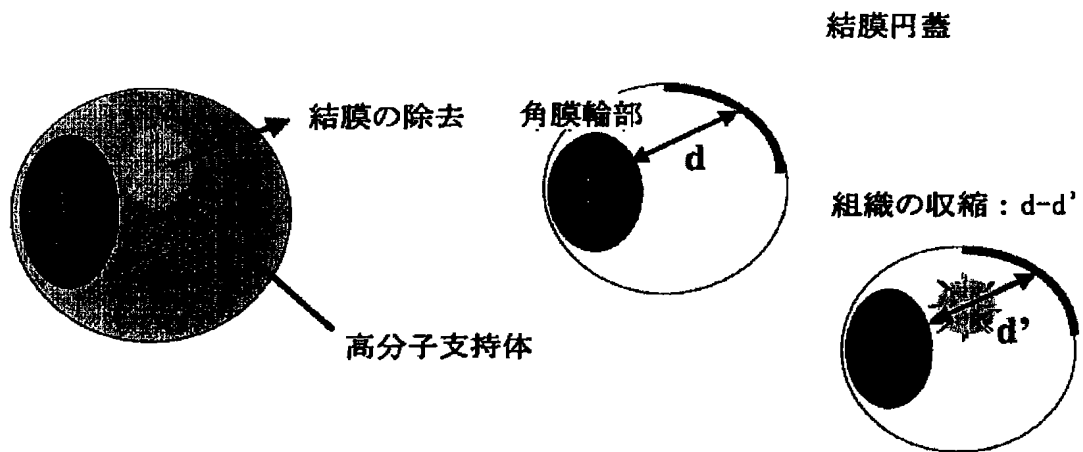
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

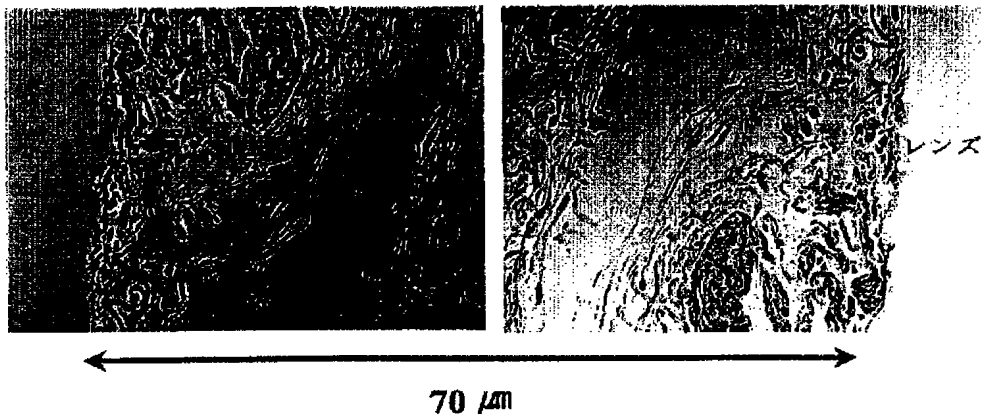


高分子支持体



フルオレセイン染色

【図5】



フロントページの続き

(72) 発明者 金 壽鉉
大韓民国ソウル特別市江南区蚕院洞61-1
韓信アパート345-706

(72) 発明者 李 ▲さん▼▲よん▼
大韓民国ソウル特別市江南区駅三洞689-
2 パームビルB-203

(72) 発明者 金 在燦
大韓民国ソウル特別市松坡区可楽洞 宇星
アパート3-305

(72) 発明者 呉 定煥
大韓民国ソウル特別市江南区開浦第2洞
開浦住公アパート418-312

Fターム(参考) 4C081 AB21 BA13 BA16 BB03 CA161
CA191 CA201 CD082 CD092
CD122 DA02 DB05 DB06
DC03